

LAPORAN AKHIR GERAN INSENTIF

Paras leptin di dalam tisu fetoplasental pada
penghamilan normal dan penghamilan hipertensi.

Asiah bte Abu Bakar
(JTMP)

Semua laporan kemajuan dan laporan akhir yang dikemukakan kepada Bahagian Penyelidikan dan Pembangunan perlu terlebih dahulu disampaikan untuk penelitian dan perakuan Jawatankuasa Penyelidikan di Pusat Pengajian.

USM JP-06

**BAHAGIAN PENYELIDIKAN
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA**

Laporan Akhir Projek Penyelidikan Jangka Pendek



1) Nama Penyelidik: Maziah bte Omar/Asiah bte Abu Bakar

Nama Penyelidik-Penyelidik Lain:

(Jika berkaitan)

1. Aminah bte Che Romli
2. Prof. Madya Harbindar Jeet Singh
-
-
-
-
-

2) Pusat Pengajian/Pusat/Unit: Pusat Pengajian Sains Perubatan

3) Tajuk Projek: Paras leptin di dalam tisu fetoplacental pada
penghamilan normal dan penghamilan hipertensi

4. (a) **Penemuan Projek/Abstrak**

(Perlu disediakan makluman diantara 100-200 perkataan di dalam Bahasa Malaysia dan Bahasa Inggeris, ini kemudiannya akan dimuatkan ke dalam Laporan Tahunan Bahagian Penyelidikan & Pembangunan sebagai satu cara untuk menyampaikan dapatan projek tuan/puan kepada pihak Universiti.)

Sila Lihat Lampiran

(b) Senaraikan Kata Kunci yang digunakan di dalam abstrak:

<u>Bahasa Malaysia</u>	<u>Bahasa Inggeris</u>
Diseksi	Dissected
Signifikasi	Significan
Tidak bersandar	Unpaired

5. Output Dan Faedah Projek

- (a) **Penerbitan** (*termasuk laporan kertas seminar*)
(*Sila nyatakan jenis, tajuk, pengarang, tahun terbitan dan di mana telah diterbitkan/dibentangkan*)
- Pembentangan poster
 - Leptin Levels in fetoplascenta tissues
from normal pregnant women and women with
pregnancy-induced hypertension
 - 30 Sept. - 2 Okt. 2002
 - Persidangan ke 13 Institut Teknologi
Makmal Perubatan Malaysia (MIMLS)
 - Hotel Crown Princess Kuala Lumpur

(b) Faedah-Faedah Lain Seperti Perkembangan Produk, Prospek Komersialisasi Dan Pendaftaran Paten

(Jika ada dan jika perlu, sila gunakan kertas berasingan)

i. Faktor pencairan yang diperolehi boleh

dijadikan rujukan untuk mengukur paras

leptin di dalam tisu fetoplasenta dengan

menggunakan teknik RIA.

ii. Memperolehi data-data normal yang boleh

dijadikan rujukan untuk kajian seterusnya.

(c) Latihan Gunatenaga Manusia

i) Pelajar Siswazah: _____

ii) Pelajar Prasiswazah: _____


iii) Lain-lain: Kakitangan baru iaitu Cik Aminah

Che Romli dapat mempelajari kaedah RIA

6. Peralatan Yang Telah Dibeli:

Tabung uji RIA

UNTUK KEGUNAAN JAWATANKUASA PENYELIDIKAN UNIVERSITI


PROF. MADYA ZABIDI AZHAR MOHD. HUSSIN
Dekan
TANDATANGANSRINGERISI
JAWATANKUASA PENYELIDIKAN
PUSAT PENGAJIAN
fn:borang/adlinaimc/nak

KANDUNGAN

- 1. ABSTRAK**
- 2. PENGENALAN**
- 3. OBJEKTIF**
- 4. PERALATAN BAHAN DAN KAEDAH**
- 5. KEPUTUSAN**
- 6. PERBINCANGAN**
- 7. KESIMPULAN**
- 8. RUJUKAN**

1. ABSTRAK

Sejak akhir – akhir ini hormon leptin disebut telah memberi kesan di dalam obstetrik dan ginekologi.(1). Paras serum leptin telah menunjukkan perbezaan yang signifikan pada wanita yang hamil berbanding dengan wanita yang mempunyai berat badan yang berlebihan (2).Punca perbezaan ini masih tidak jelas sehinggalah tisu plasenta disebut sebagai sumber peningkatan leptin didalam penghamilan. Maka kajian ini dilakukan untuk menentukan paras leptin pada tisu- tisu fetoplasenta penghamilan normal dan penghamilan hipertensi.

Selepas proses kelahiran , sebanyak 4 gram tisu amnion , chorion laeva dan plasenta telah diambil dari tisu fetoplasenta ($n = 25$, $PIH = 9$). Tisu ini dimasukkan ke dalam larutan penampan Krebs Heinslet pH 7.4 pada suhu bilik. Seterusnya tisu ini dicuci dengan menggunakan larutan yang sama dan dikeringkan dengan menggunakan kertas penuras. 2 gram dari setiap tisu telah dihancurkan di dalam 2 ml larutan Kreb Heinslet selama 2 minit dengan menggunakan mesin penghancur. Bahan ini diemparkan selama 20 minit pada 4000 putaran seminit .di dalam pengempar sejuk. Seterusnya supernatan diasingkan dan mendapan ini diulangi proses yang sama sekali lagi. Kedua – dua supernatan ini disatukan dan disimpan pada suhu $- 70^{\circ} \text{C}$ sehingga ujian Leptin dengan menggunakan RIA dilakukan. Ujian t- tidak bersandar telah dilakukan bagi bandingan antara kumpulan kehamilan normal dengan kehamilan hipertensi dan nilai $p < 0.05$ dianggap signifikan.

Paras leptin di dalam tisu plasenta didapati lebih tinggi secara signifikan pada kedua-dua kumpulan berbanding tisu chorion laeva dan amnion($p < 0.001$). Paras leptin pada chorion laeva dan amnion didapati tiada perbezaan yang signifikan pada kedua-dua kumpulan. Kepekatan leptin pada amnion mempunyai korelasi yang tinggi dengan chorion laeva pada kedua- dua kumpulan ($p = 0.000$). Kepekatan leptin pada plasenta juga mempunyai korelasi yang tinggi dengan chorion laeva dan amnion ($p = 0.001$)Paras leptin pada tisu amnion dan chorion laeva didapati mempunyai perbezaan yang signifikan antara penghamilan normal dan penghamilan hipertensi.($p < 0.05$).

Kesimpulan yang didapati dari kajian ini menunjukkan kesahihan terdapatnya leptin pada tisu fetoplasenta. Paras leptin didapati berbeza antara lapisan tisu tersebut. Paras leptin tisu amnion dan chorion laeva didapati lebih tinggi pada penghamilan hipertensi berbanding penghamilan normal. Perbezaan yang signifikan ini masih tidak dipastikan sebabnya dan kajian selanjutnya diperlukan untuk mengetahui peranan leptin di dalam penghamilan hipertensi.

LEPTIN LEVELS IN FETOPLACENTAL TISSUES FROM NORMAL PREGNANT WOMEN AND WOMEN WITH PREGNANCY-INDUCED HYPERTENSION .

Asiah Abu Bakar, Aminah Che Romli, Harbindar Jeet Singh . *Dept Physiology, School Medical Sciences, Universiti Sains Malaysia, 16150 Kubang Kerian, Kelantan*

Leptin has been implicated in a number of obstetrical and gynecological diseases (1). Serum leptin levels have been shown to be significantly higher in pregnant women when compared to non-pregnant obese women (2). The precise source of the extra leptin remains unclear although the placenta has been suggested as the additional source of this leptin. The role of leptin in pregnancy-induced hypertension remains unknown. As the abnormality in PIH is presumed to lie in the placenta we therefore measured the levels of leptin in fetoplacental tissues from normal women and women with pregnancy-induced hypertension (PIH)

Four grams each of amnion, chorion leave and placenta were carefully dissected from fresh, vaginally delivered placenta from normal women (n=25) and women with PIH (n=9). After thorough rinsing with Krebs Heinslet buffer, pH 7.4, at room temperature, the tissues were blot-dried on a filter paper. Two grams of each of the tissues was individually homogenized in 2 ml of Krebs Heinslet, pH 7.4 for 2 minutes. Following centrifugation for 20 minutes at 4,000 rpm in a refrigerated centrifuge , the supernatant was remove . After that the pellet was re-suspended in the same buffer, re-homogenized, centrifuged and the two lots of supernatants were pooled and stored at – 70°C for analysis at a later date. Leptin in the extracts was determined using commercially available RIA Kits. Statistical analysis was performed using Student's 't' test for unpaired observations.

Leptin concentration in the placenta was significantly higher in both the groups when compared to its concentration in the corresponding chorion leave and amnion ($p < 0.01$) There were no significant differences in the leptin concentrations between the chorion leave and amnion in either of the two groups. Leptin concentration in the amnion was highly correlated with that in the chorion leave in both the groups ($p = 0.000$). Similarly, placental leptin also correlated significantly with that in the chorion leave and amnion ($p = 0.001$). Leptin concentration in the amnion and chorion leave from women with PIH was significantly higher when compared to that in similar tissues from normotensive women ($p < 0.05$).

In conclusion, our observations confirm the presence of leptin in the fetoplacental tissues. More significantly however, leptin concentration in tissues from women with PIH appears somewhat higher, particularly in the amnion and the chorion laeve. The significance and the reasons for this remain uncertain and further studies are needed to ascertain the role of leptin in PIH.

References

1. Juan Carlos and Liliana (2001) *Obstetrical and Gynecological Survey* 56:225-230.
2. Hiroko et al (1998) *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83:3225-3229.

2. PENGENALAN

Leptin menurut sebutan Greek adalah Leptos yang bermakna 'thin' . Ianya dinamakan oleh Halaas et al (3) merupakan sejenis molikul. Dalam tahun 1994 Zhang et. al (4) yang membuat kajian terhadap baka mencit yang obesiti menunjukkan kekurangan gen ini menyebabkan perubahan pada kawal atur berat badan. Leptin yang akhir – akhir ini juga dikenalpasti sebagai “ cytokine type 1” terlibat di dalam kematangan dan pembesaran sel. Kajian menunjukkan terdapat perhubungan penyakit obstetrik dan ginekologi dengan cytokine ini selain peranannya seperti diabetes dan obesiti.

Paras leptin semasa mengandung juga telah diukur . Didapati kepekatan serum leptin di dalam serum maternal , cecair amnion, darah tali pusat dan di dalam bayi tinggi selepas kelahiran.

Oleh itu kajian yang ingin dijalankan adalah untuk menentukan paras sebenar leptin pada bahagian – bahagian tisu fetoplasenta normal dan perbandingannya dengan kehamilan hipertensi.

3. OBJEKTIF

Tujuan kajian ini dijalankan adalah seperti berikut:

1. Mempelajari teknik pemprosesan plasenta.
2. Menentukan faktor pencairan leptin untuk diukur menggunakan teknik RIA
3. Memahirkan diri dalam mengendalikan ujian – ujian melibatkan RIA.
4. Mendapatkan keputusan kepekatan ujian leptin pada lapisan amnion chrion dan plasenta pada kehamilan normal serta hubungannya.
5. Membandingkan keputusan ujian kehamilan normal dengan kehamilan hipertensi

4. PERALATAN, BAHAN DAN KAEDAH

1. Hemoginizer (IKA labortechnic)
2. Ph Meter.
3. Refrigerated centrifuge.
4. Gamma counter
5. Ependorf pipet 100 ul, 1000 ul
6. pipet man 5ml.
7. Dispencer pipet.
8. Mixer
9. Penimbang
10. Kertas penyerap
11. Tabung uji 25 ml.
12. Tabung uji 10 ml
13. Tabung uji RIA (propylene)
14. Air ceria.
15. Larutan Krebs Heinslet.
16. Ethylemetetraacetic acid.(EDTA)
17. Kit sensitive human RIA(LINCO Research , Inc)

4.1 Kaedah pemilihan sampel.

1. Normotensif (Tekanan darah di bawah paras 120/80)
2. PIH (Tekanan darah di atas paras 130 / 90)
3. Paras glukus di dalam urin untuk sampel PIH adalah negatif dan tiada penyakit lain.

Data – data berikut telah dicatat sebelum sampel dipungut:

1. No pendaftaran
2. Umur ibu
3. Minggu penghamilan
4. Gravida dan para.

5. Berat ibu
6. Berat bayi
7. Berat plasenta keseluruhan.

4.2 Kaedah pemprosesan sampel.

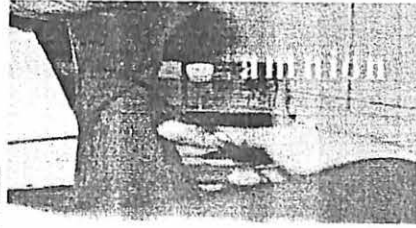
Kaedah pemprosesan sampel terbahagi kepada dua bahagian:

4.2.1 Pemprosesan lapisan amnion, chorion dan plasenta keseluruhan.

Lapisan ini telah diasingkan secara segera selepas darah tali pusat diambil. Sebanyak 4 gram tisu amnion, chorion laeva dan plasenta telah dipotong dan dimasukkan ke dalam tabung uji yang mengandungi larutan Krebs Heinslet secara berasingan. Kemudian sampel-sampel ini dicuci sebanyak lima kali dengan menggunakan larutan tersebut seterusnya setiap sampel akan dikeringkan dengan menggunakan kertas penyerap.

Sebanyak 2 gram tisu dari setiap lapisan telah dipotong lalu ditimbang dan sebanyak 2 ml larutan Krebs Heinslet telah dimasukkan ke dalam tabung uji isipadu 25 ml (di mana tabung uji ini mempunyai diameter 2.5 sm). Proses menghancurkan sampel menggunakan alat hemoginizer telah dilakukan selama 2 minit. Seterusnya sampel tersebut diemparkan pada kelajuan 4000 pusingan seminit selama 20 minit. Lapisan supernatan telah diasingkan dan sekali lagi mendapan sampel diulangi proses yang sama. Supernatan ini telah dimasukkan ke dalam tabung uji yang sama (faktor pencairan iaitu 1 : 3). Sampel ini juga telah disimpan pada suhu - 70⁰ selsius sehingga ujian esei dilakukan.

Disiksi tisu fetoplasenta



4.3 Kit sensitive human Leptin.

Kit yang digunakan untuk kajian adalah dari Linco Research , Inc.

Bahan – bahan di dalam kit ini adalah seperti berikut :

1. Buffer untuk asei iaitu (0.05 M Phosphosaline, pH 7.4, 0.025 M EDTA, 0.1 % Sodium Azide, 0.05% Trinton x-100, dan 1 % RIA grade BSA) - 40 ml.
2. Sensitif human leptin Antibodi (gunea pig) -20 ml.
3. 1125 – Human Leptin label (, uCi, <111 kBq) – Dilarutkan dengan hydrating buffer sebanyak 27 ml.
4. Hydrating Buffer (gunea pig IgG)- 27 ml.
5. Standard sensitive human leptin. (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 2.0,5.010.0 ng/ml) – 1ml
6. Bahan precipitating – 260 ml.

4.4 Kaedah untuk melakukan asei.

Kesemua tabung uji telah dilabel dan ujian dilakukan secara duplikasi.

Hari pertama

1. Tabung uji pertama dan kedua dikosongkan dan dilabel sebagai TOTAL
2. 300 ul buffer asei di masukkan ke dalam tiub NSB (3, 4) dan 200ul REF (5,6)
100 ul tabug uji ke 7 dan seterusnya hingga tiub ke 22.
3. 100 ul standard , sampel dan kawalan telah dipipet ke tabung uji yang telah dilabelkan.
4. 100 ul sensitive human leptin antibodi di masukkan kedalam semua tabug uji kecuali NSB dan TOTAL.
6. Sampel digoncang dengan menggunakan 'mixer' secara sekata dan dieramkan semalaman.

Hari kedua

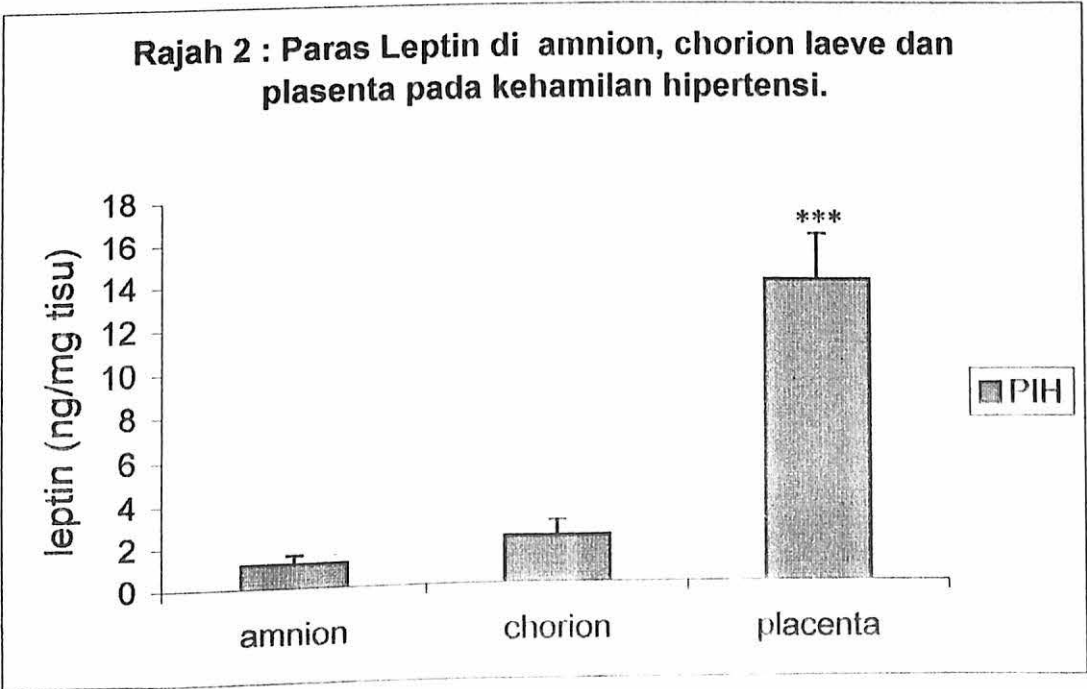
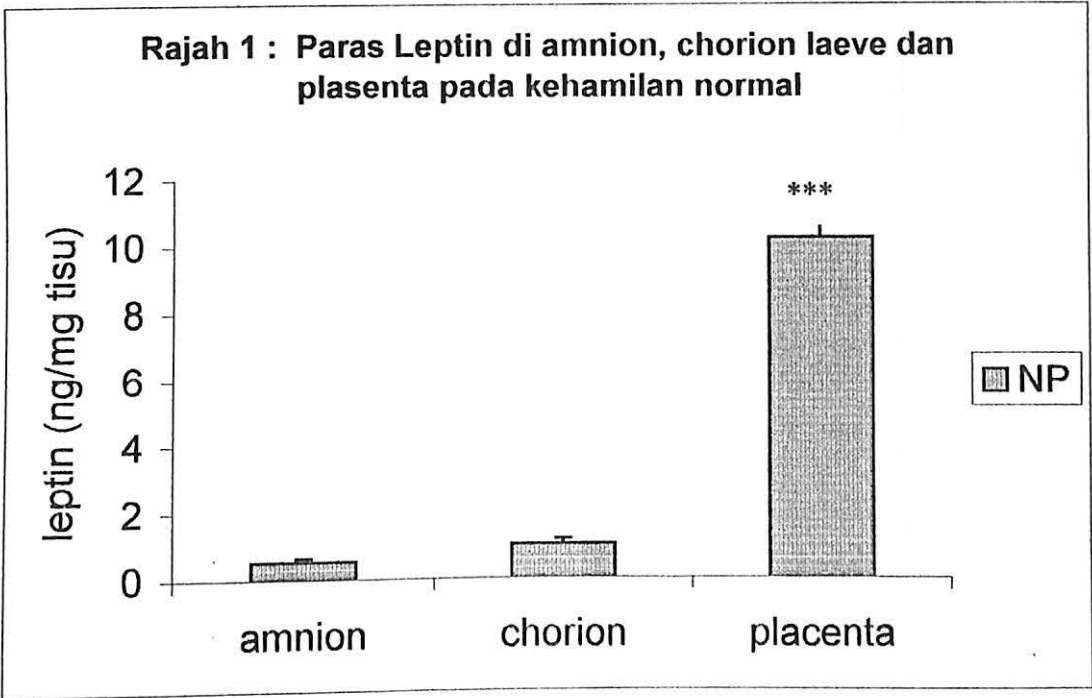
1. 100 ul human leptin telah dipipet ke dalam setiap tabung uji.
2. Goncang secara sekata dan dieramkan semalaman.

Hari ke-tiga

1. 1 ml precipitating reagent dipipet ke dalam setipa tabung uji kecuali TOTAL
2. Sampel digoncang secara sekata dan dieramkan di dalam suhu 4⁰ selsius selama 20 minit.

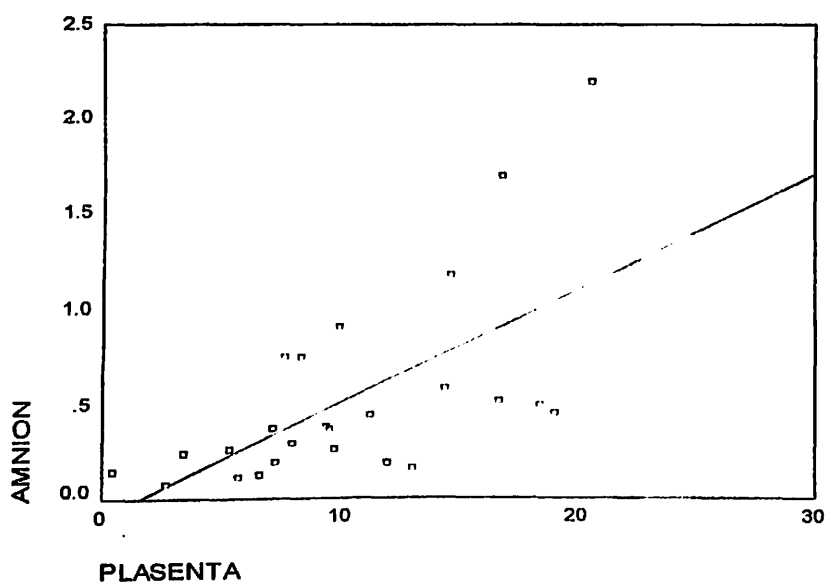
3. Kesemua sampel ini diemparkan pada suhu 4⁰ selsius selama 30 minit pada kelajuan 4000 pusingan seminit.
4. Keputusan kepekatan leptin didapati dari penggunaan 'gamma counter' selama 3 minit untuk setiap sampel.

5. KEPUTUSAN



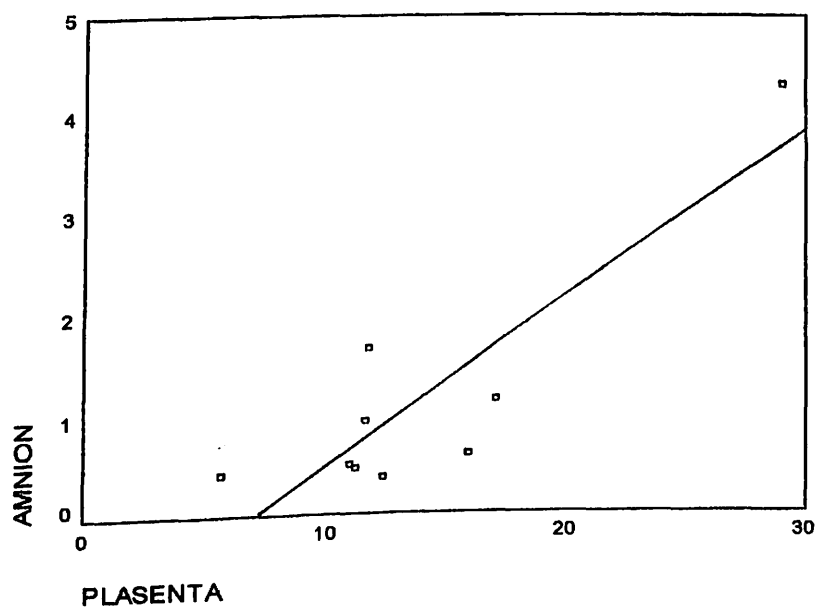
*** $p < 0.001$: Terdapat perbezaan yang signifikan pada paras leptin di tisu plasenta berbanding tisu amnion dan chorion laeva.

Rajah 3 : Graf hubungan paras leptin antara tisu plasenta dengan tisu amnion pada kehamilan normal.



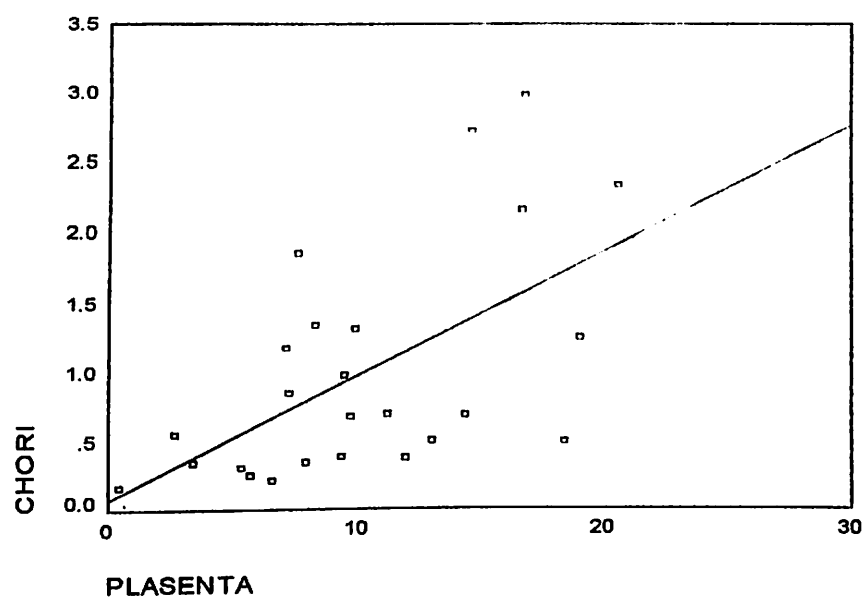
Terdapat korelasi positif paras leptin di antara tisu plasenta dengan tisu amnion .
($r=0.667$, $p= 0.001$).

Rajah 4 : Graf hubungan paras leptin di antara tisu plasenta dengan tisu amnion pada kehamilan hipertensi



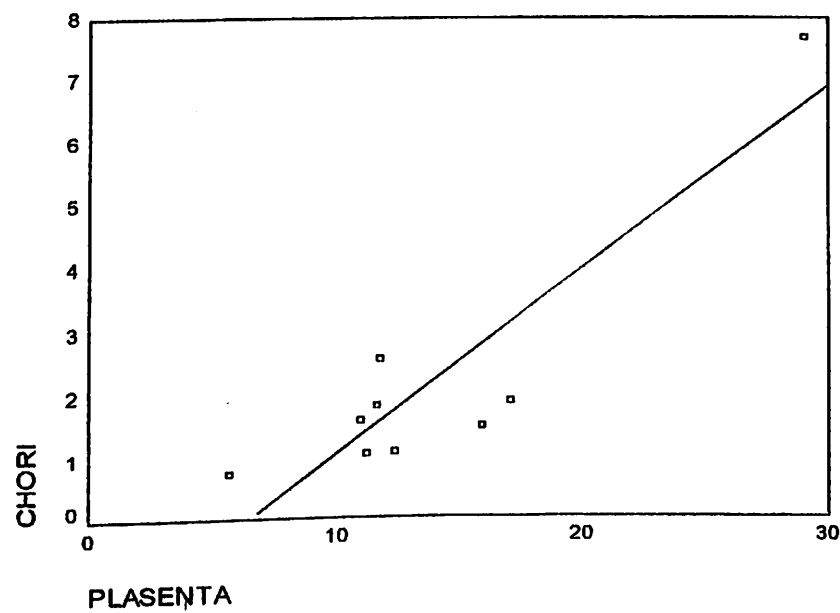
Terdapat korelasi positif¹ paras leptin di antara tisu plasenta dengan tisu amnion .
($r=0.872$; $p= 0.001$)

Rajah 5 : Graf hubungan paras leptin di antara tisu plasenta dengan tisu chorion pada kehamilan normal.



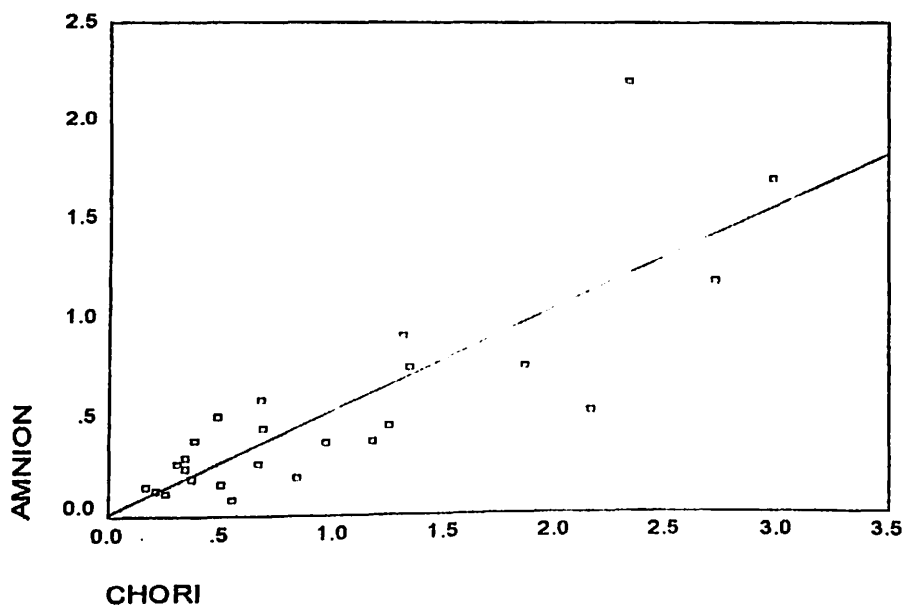
Terdapat korelasi positif paras leptin diantara tisu plasenta dengan tisu chorion laeva.
($r = 0.611$; $p < 0.001$)

Rajah 6 : Graf hubungan paras leptin di antara tisu plasenta dengan tisu chorion pada kehamilan hipertensi.



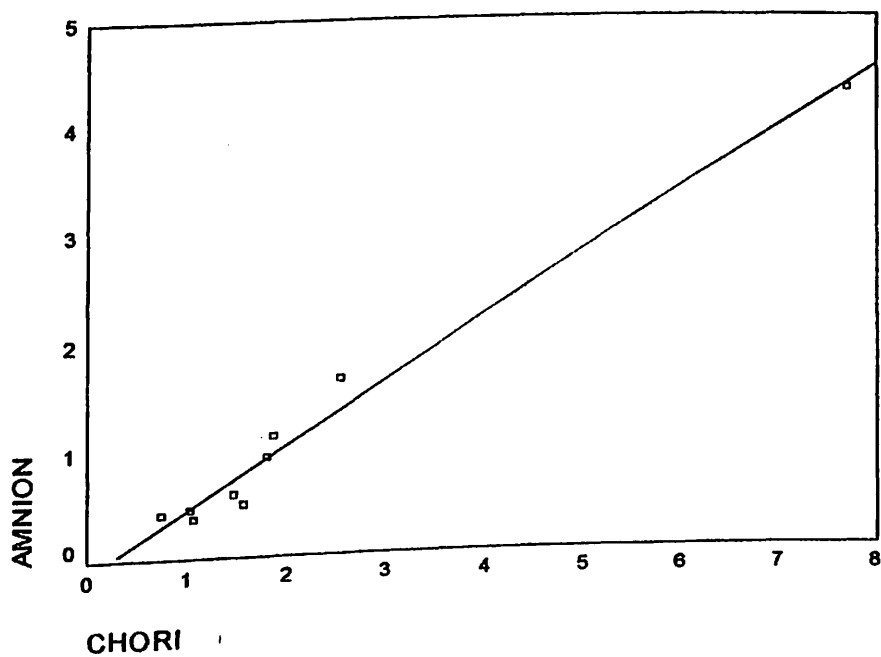
Terdapat korelasi positif paras leptin diantara tisu plasenta dengan tisu chorion .
($r = 0.898$; $p < 0.001$)

Rajah 7: Graf hubungan paras leptin di antara tisu chorion dengan tisu amnion pada kehamilan normal



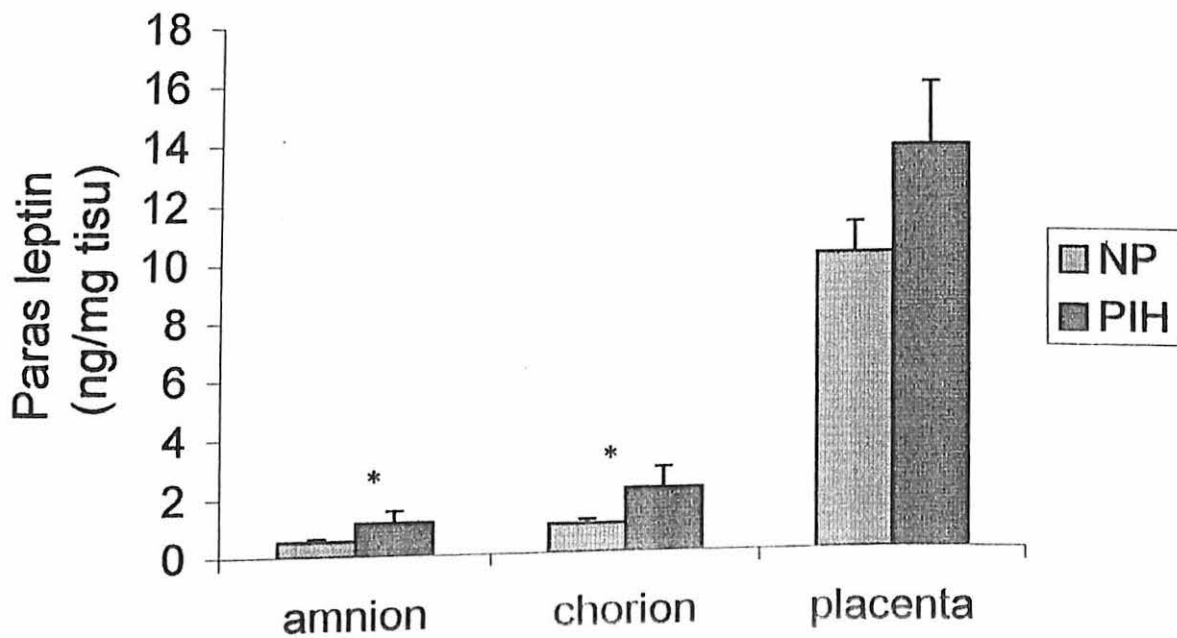
Terdapat korelasi positif pada paras leptin diantara tisu chorion laeva dengan amnion.
($r = 0.831$; $p < 0.000$)

Rajah 8 : Graf hubungan paras leptin di antara tisu chorion dengan tisu amnion pada kehamilan hipertensi.



Terdapat korelasi yang positif pada paras leptin diantara tisu chorion laeva dengan amnio ($r = 0.990$; $p < 0.000$)

Rajah 9 :Paras leptin di amnion, chorion dan plasenta pada kehamilan normal dan kehamilan hipertensi



* $P<0.05$: Terdapat perbezaan yang signifikan pada tisu amnion dan chorion laeva diantara kumpulan penghamilan normal dengan penghamilan hipertensi.

Jadual 10 : Keputusan mean ± SEM perbandingan kehamilan normal dan hipertensi

	NORMAL (Mean± SEM)	PIH (Mean± SEM)
n	25	9
UMUR (tahun)	29.20±1.28	28.33± 2.70
BERAT IBU (kg)	63.42 ±1.59	70.44± 4.40
BERAT BAYI (kg)	3.33±0.08	3.14±0.16
BERAT PLASENTA (kg)	0.67±0.02	0.58±0.02 *
AMNION (ng/mg tisu)	0.52±0.10	1.15± 0.41 *
CHORION (ng/mg tisu)	0.99± 0.16	2.19±0.71 *
PLASENTA (ng/mg tisu)	10.28±1.06	13.95±2.17

* Perbezaan yang signifikan antara kumpulan kehamilan normal dan hipertensi . (p<0.05)

6. PERBINCANGAN

1. Kepekatan leptin di dalam plasenta didapati lebih signifikan jika dibandingkan dengan kepekatan di dalam chorion leave dan amnion (p<0.001);
2. Kepekatan leptin di dalam amnion mempunyai korelasi positif yang tinggi dengan chorion laeva di dalam kedua- dua kumpulan (p< 0.000).Kepekatan leptin di dalam plasenta juga mempunyai korelasi dengan chorion laeva dan amnion pada kedua- dua kumpulan.
3. Walaubagaimanapun kepekatan leptin di dalam chorion laeva dan amnion pada kumpulan yang sama tidak mempunyai perbezaan.
4. Jika dibandingkan di antara kehamilan normal dengan kehamilan hipertensi didapati terdapat perbezaan yang signifikan didalam tisu chorion laeva dan amnion (p<0.05).

5. Terdapat korelasi positif yang signifikan antara berat bayi dengan berat plasenta ($r = 0.772$, $p = 0.002$) Ini menunjukkan semakin berat bayi yang dilahirkan semakin berat plasenta nya.
6. Terdapat juga korelasi yang positif antara berat ibu dengan berat bayi ($r = 0.591$; $p = 0.002$)

7. KESIMPULAN

Hasil kajian menunjukkan terdapatnya leptin di dalam tisu fetoplasenta dan tisu plasenta didapati mengandungi kepekatan leptin yang lebih tinggi berbanding dengan tisu amnion dan chorion laeva. Paras leptin, terutamanya pada tisu amnion dan chorion laeva terdapat perbezaan yang signifikan pada kedua – dua kumpulan. Perbezaan yang signifikan ini masih tidak jelas dan kajian seterusnya perlu dilakukan untuk mengetahui peranan leptin di dalam kehamilan hipertensi.

8. RUJUKAN

1. Juan Carlos and Liliana et al. Leptin in Obstetrics and Gynecology : CME review article 2001; 56 :225-230.
2. Hiroko et al . Augmented placental production of leptin in preeclampsia : possible involvement of placental hypoxia. Journal of Endocrinology and Metabolism 1998; 83 : 3225-3229.
3. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M et al. Weight – reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. Sciences 1995; 269 : 543 – 546.
4. Hoggard N, Hunter L, Duncan J et al. Leptin and leptin receptor mRNA protein expression in the murrine fetus and placenta . Proc Nati Acad Sci USA 1997; 94 : 11073- 11078.